

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 148—151, März 1969

Zwei einfache spezifische Methoden zur Bestimmung der Urinporphyrine

Von M. DOSS und W.-K. PHILIPP

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg a. d. Lahn (Direktor: Prof. Dr. R. Siegert)

(Eingegangen am 26. Januar 1969)

Herrn Prof. Dr. J. Brugsch zum 60. Geburtstag gewidmet

Zwei einfache spezifische Methoden zur Bestimmung der Porphyrine im Urin auf der Basis der spektrophotometrischen Analyse von Porphyrinmethylester-Cu-Chelaten werden beschrieben. Zunächst wird mit einem Suchtest die Ausscheidung der Gesamtporphyrine ermittelt. Wenn diese erhöht ist, wird eine dünn-schichtchromatographische Trennung der Porphyrinmethylester auf vorgefertigten Kieselgel-Karten durchgeführt, um die Porphyrinkomponenten des Urins zu differenzieren.

Two simple specific methods for the determination of urinary porphyrins

Two simple specific methods are described for the determination of urinary porphyrins, based on the spectrophotometric analysis of the porphyrin methyl ester-Cu-chelates. The total excretion of porphyrins is first determined. If this is high, the porphyrin methyl esters are separated by thin layer chromatography on ready-made kieselgel cards, in order to differentiate the urinary porphyrin components.

Zum Ausschluß einer erhöhten Porphyrinausscheidung im Urin ist die Bestimmung der Gesamtporphyrine für die klinische Diagnostik ausreichend. Eine Differenzierung vorwiegend zwischen Kopro- und Uroporphyrin, die sich mit hoher Trennschärfe dünn-schichtchromatographisch sehr einfach durchführen läßt, wird in den meisten Fällen erst bei einer Porphyrinurie angebracht sein.

Auf der Basis der spektrophotometrischen Messung von Porphyrinmethylestern als Kupfer-Chelatkomplexe (1) wurde ein Test ausgearbeitet, mit dem eine Erhöhung der Porphyrine im Urin ausgeschlossen oder in einem limitierten Bereich bestimmt werden kann. Sind die Porphyrine erhöht, wird eine dünn-schichtchromatographische Auftrennung auf Kieselgel-Fertigfolien angeschlossen.

Material und Methoden

Reagenzien

Methanol- H_2SO_4 1 Vol.-proz. (1 m/ konz. H_2SO_4 zu 99 m/ Methanol p. a.), NaHCO_3 , Na_2CO_3 , Chloroform, Methanol, Benzol, Essigsäureäthylester, Na_2SO_4 (p. a. Reagenzien); Talk; DC-Karten SI (Riedel de Haën 37351); Kupfer(II)-acetat-Lösung 0,2proz. (w/v) in Chloroform-Methanol (1:1, v/v) (1).

Methodik

Allgemeines

Isolierungen und Analysen von Porphyrinen müssen in abgedunkelten Gefäßen oder in einem abgedunkelten Raum durchgeführt werden. Dagegen brauchen die Kupfer-Chelatkomplexe der Porphyrine nicht vor Licht geschützt werden.

A. Standardverfahren zur Bestimmung der Gesamtporphyrine

In ein Schliffreagenzgefäß mit spitzem Boden (100 × 18 mm) werden 0,2 g Talk vorgelegt und 5 m/ Urin hinzugefügt. Das Gefäß wird zur Adsorption der Porphyrine 2 Min. geschüttelt. Danach pipettiert man die Suspension mit einer Saughütchenpipette langsam auf ein angefeuchtetes Rundfilter (Ø 1,8 cm), das auf einer Porzellannutsche (Hirsch-Trichter) liegt. Die Filtration wird

mit Hilfe einer Absaugvorrichtung, die mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden ist, etwas beschleunigt. Das Filter mit Talkschiebt wird unter dem Kaltluft-Föhn getrocknet (15 Min.) und im UV-Licht (355 nm) betrachtet. Eine intensive Rotfluoreszenz des Talkes unter dem UV-Licht (DESAGA-Intensivstrahler 131000) ist bereits ein sicherer Hinweis für das Vorliegen von Porphyrinen. Man löst das trockene Filter mit dem Spatel und bringt es zusammen mit der anhaftenden Talkschiebt in den Boden eines Schliffgefäßes, wo es mit 1 m/ Methanol-Schwefelsäure zur Bildung der Porphyrinmethylester bei Raumtemperatur versetzt wird. Nach 10 (8—12) Stdn. werden 2 m/ Chloroform und zur Erhöhung des pH-Wertes 0,35 g Na_2CO_3 zugegeben. Nach Kontrolle des pH (6,0) läßt man Na_2CO_3 und Talk absitzen, nimmt den Überstand in eine Glaskapillare auf und filtriert ihn durch ein Faltenfilter von 4 cm Ø in ein kleines Schliffgefäß (80 × 14 mm). 0,5 m/ des Filtrats werden in eine Halbmikroküvette (d = 20 mm, Innenbreite 4 mm) übergeführt und mit 0,5 m/ Cu(II)-acetat-Lösung gemischt. Die Küvette wird verschlossen. Nach 10 Min. wird die Probe gegen einen genauso hergestellten Leerwert gemessen, der aus dem ebenfalls mit 0,2 g Talk versetzten und geschüttelten Urinfiltrat hervorgeht und gleichermaßen mitgeführt wird, wobei man zur Nullpunkt-Einstellung des Zweistrahlphotometers je 1,5 m/ Chloroform-Methanol-Filtrat und 1,5 m/ Cu(II)-acetat-Lösung mischt. Die spektrophotometrische Registrierung erfolgt von 600 bis 370 nm (Abb. 1). Der Porphyringehalt wird nach folgender Formel berechnet:

$$\mu\text{g Porphyrin/m/ Urin} = E \cdot 1,14$$

Der Faktor 1,14 resultiert aus den Mittelwerten der Molekulargewichte und millimolaren Extinktionskoeffizienten von Kopro- und Uroporphyrin (1) sowie aus den Volumina von eingesetztem Urin und Lösungsmitteln.

Richtigkeit, Empfindlichkeit und Spezifität der Methode

Die Richtigkeit des Verfahrens wurde durch Wiederauffindungsversuche ermittelt. Zugewetztes Kopro- und Uroporphyrin in Mengen von 0,6 bis 0,7 $\mu\text{g/m/}$ wurde zwischen 97 und 100% wiedergefunden (VK = 2,4%, n = 6). Die Empfindlichkeit lag bei 0,04 $\mu\text{g/m/}$. Die statistische Prüfung der Analysen eines porphyrischen Urins ergab folgende Werte ($\mu\text{g/m/}$): $\bar{x} \pm 2s = 0,672 \pm 0,57$, VK = 4,27, n = 4. Die Spezifität ist durch die Reaktion des metallfreien zyklischen Tetrapyrrols mit dem Kupferreagenz und die dabei entstehende steile Soret-Bande gegeben (1) (Abb. 1a). Störende Einflüsse von Urinkomponenten auf die Absorp-

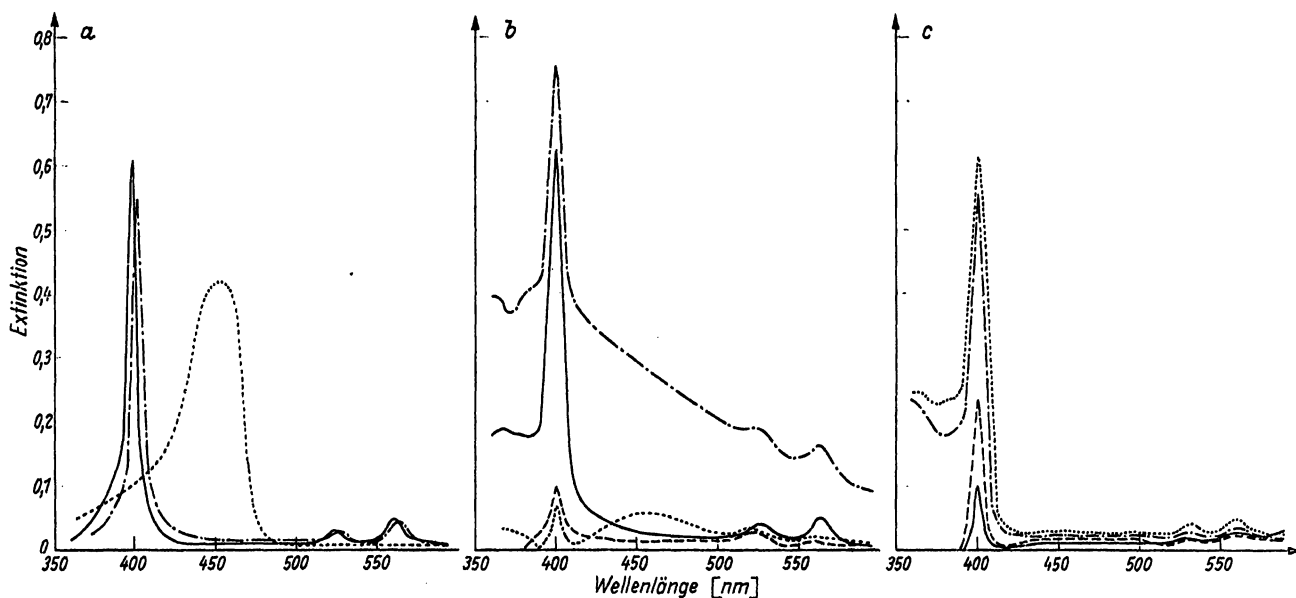


Abb. 1

Absorptionsspektren der Urinporphyrine als Methylester-Cu-Chelatkomplexe. a) Vergleichssubstanzen: Koproporphyrin (—), Uroporphyrin (---); Absorption von Bilirubin in CHCl_3 (····). b) Porphyrischer Urin (PU) gegen Cu(II) -acetat-Lösung (·-·-·), PU gegen Leerwert (—); Normalurine ohne (—) und mit Absorption im Bereich bei 450 nm (····). c) Kinetik der Veresterung, gemessen durch Komplexbildung der Methylester nach 2 (—), 4 (---), 6 (·-·-·) und 8 (····) Stdn. Analyse nach 12 Stdn. s. b (—). Spektralphotometer DB-G Beckman mit 10''-Kompensationsschreiber. Der Patientenurin enthielt nach dünnsschichtchromatographischer Auftrennung Kopro-0,05, Heptacarboxy-0,18 und Uroporphyrin 0,39 $\mu\text{g/ml}$ neben kleinen Anteilen von Penta- und Hexacarboxyporphyrin

tion der Soret-Bande der Porphyrinmethylester-Cu-Komplexe wurden nicht festgestellt (Abb. 1b). Wie die Abbildung 1c zeigt, bilden freie Porphyrinsäuren mit Cu(II) -acetat keine Chelate, so daß die Kinetik der Veresterung anhand der Komplexbildung verfolgt wurde (Abb. 1c). Chelat-Komplexe von freien Porphyrinen konnten mit anderen Kupfersalzen auch in einer wäßr. Lösung nicht dargestellt werden.

Modifikation für Filterphotometer

Auf Abbildung 2 sind die Eichkurven von Kopro- und Uroporphyrin am Soret-Maximum und bei der Absorptionsmessung mit Hg 405 nm gegenübergestellt. Der unterschiedliche Anstieg der Eichgeraden von Kopro- und Uroporphyrin am Soret-Maximum ist auf die verschieden starke Zunahme von ϵ_{MM} bei der Chelatbildung der beiden Substanzen zurückzuführen. Demgegenüber beruht das umgekehrt proportionale Verhalten der Konzentrationskurven der Substanzen bei 405 nm auf der Lage der Absorp-

tionsmaxima ihrer Cu-Komplexe (1): Bei 405 nm wird Koproporphyrin nur im distalen Bereich der Absorptionsbande erfaßt (Abb. 1a). Während die im Spektrophotometer erhaltenen Analysendaten aus Urinproben mit den entsprechenden Eichgeraden im gesamten Meßbereich gut korrelieren, nimmt die Präzision bei 405 nm unter einem Porphyringehalt von 0,15 $\mu\text{g/ml}$ ab. Dagegen können Extinktionen über 0,12 als Hinweis auf eine erhöhte Porphyrinausscheidung gewertet werden.

B. Dünnsschichtchromatographie der Porphyrinmethylester

Die Dünnsschichtchromatographie der Porphyrinmethylester (2, 3) wird auf Kieselgel-Platten ausgeführt, wobei man mit Kieselgel-H bestrichene Glasplatten (2) oder vorgefertigte Dünnsschichtplatten mit fester Schicht verwenden kann (3). Mit beiden Materialien wird eine scharfe Trennung nach Anzahl der Carboxylgruppen im Molekül erzielt (Abb. 3).

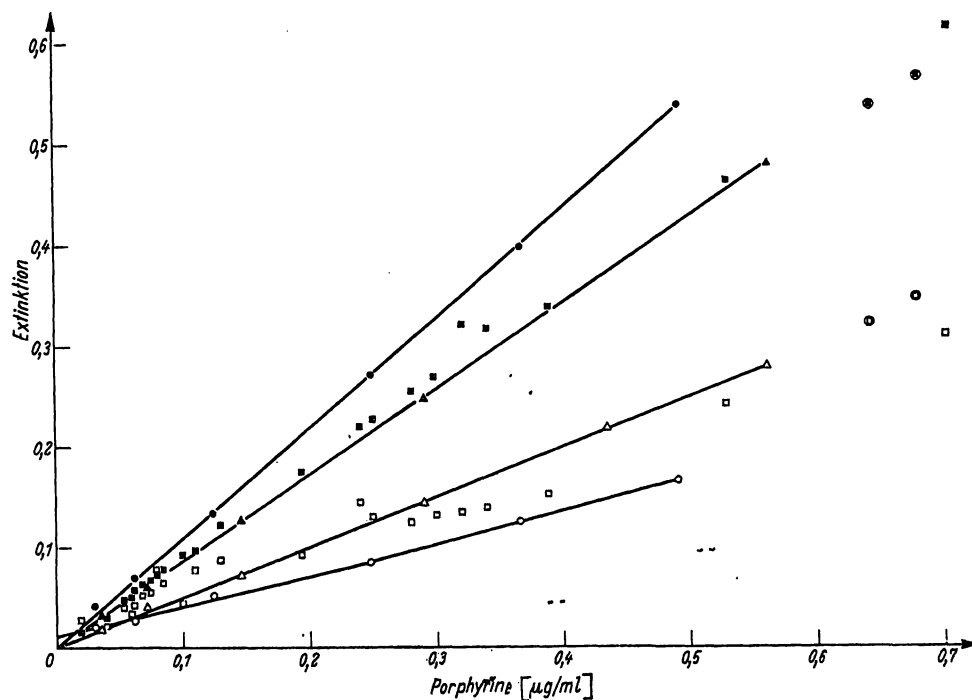


Abb. 2

Verhältnis zwischen Extinktion und Konzentration von Kopro- und Uroporphyrinmethylester-Cu-Chelaten (K, U) bei Absorptionsmessungen am Soret-Maximum (S) (Spektralphotometer DB-G Beckman) und bei Hg 405 nm (Filterphotometer Eppendorf 1101) zum Vergleich mit Urinalysen nach der Standardmethode ($d = 2 \text{ cm}$). • K_S , ○ K_{405} , ▲ U_S , △ U_{405} ; ■ Urinalysen am DB-G, □ dito bei Filter 405 nm; Die mit einem Kreis versehenen Werte enthalten Zusätze von Uroporphyrin zum Normalurin

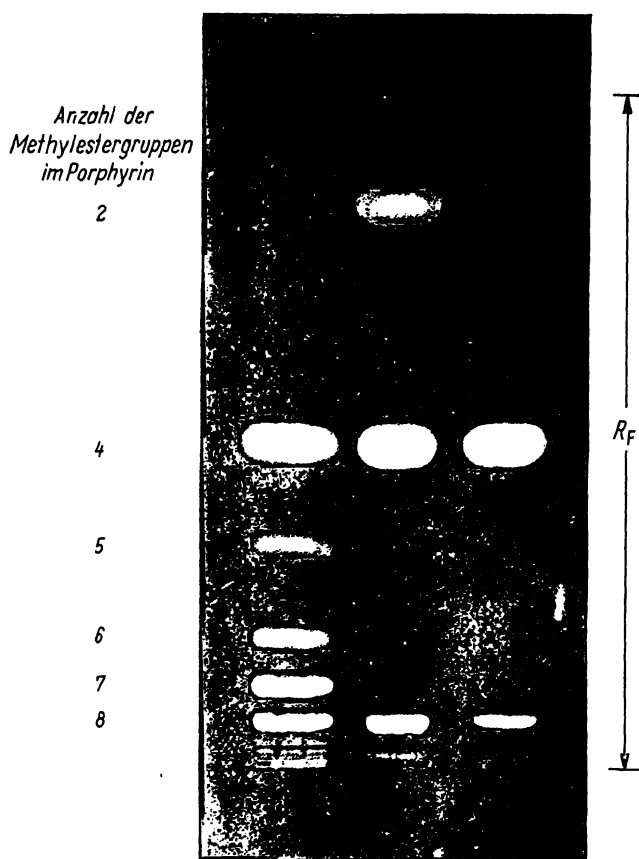


Abb. 3

Kieselgel-Dünnschichtchromatogramm (DC-Karten SI, Riedel de Haën 37351) mit Porphyrinmethylestern (P-ME). 1. Urin bei Porphyrria cutanea tarda (von u. nach o.): Uro-, Heptacarboxy-, Hexacarboxy-, Pentacarboxy- und Kopro-P-ME (Extrakt aus 2 ml Urin). 2. Testsubstanzen (von u. nach o.): Uro-, Kopro- und Proto-P-III-ME. 3. Normalurin (Extrakt aus 20 ml). Entwicklung des Chromatogramms im Lösungsmittelsystem Benzol-Essigsäureäthylester-Methanol 85:13,5:1,5, v/v). Nachweis der Porphyrine unter dem UV-Licht (355 nm)

Für eine spektrophotometrisch leerwertfreie Analyse der aus dem Chromatogramm eluierten Porphyrine ist es zweckmäßig, die DC-Karten SI vorzubehandeln. Zur Eliminierung lipophiler Verunreinigungen läßt man die Karten nacheinander in den Lösungsmittelsystemen Chloroform-Methanol (2:1, v/v) und Benzol-Essigsäureäthylester (4:1, v/v) vorlaufen (3). Anschließend erfolgt die Reaktivierung der Karten in 30 Min. bei 80°.

Nachdem eine erhöhte Porphyrinausscheidung mit dem Standardverfahren festgestellt und/oder auch bei der Adsorption eine Rotfluoreszenz des Adsorbens beobachtet wurden, werden die Porphyrine von 5 ml Urin mit 0,4 g Talk wie unter A. beschrieben adsorbiert und mit 2 ml Methanol-H₂SO₄ (1 Vol.-proz.) verestert. Das Gefäß wird fest verschlossen und bleibt 12 Std. bei Raumtemperatur stehen. Danach fügt man 2 ml CHCl₃ hinzu, schüttelt kurz auf, läßt den Talk wieder absitzen und überführt die Lösung mit einer Glaskapillare durch ein Faltenfilter (Ø 5,5 cm) in ein Extraktionsgefäß (180 × 18 mm, NS 14,5). Mit 4 ml Chloroform-Methanol (1:1, v/v) wird der im Veresterungsgefäß gebliebene Talk, der im UV-Licht (355 nm) auf Rotfluoreszenz geprüft wird, nochmals aufgeschüttelt. Nach Absitzen des Talks wird die überstehende Lösung ebenfalls wieder abgezogen und in das Extraktionsgefäß filtriert. Zeigt das Adsorbens immer noch eine Rotfluoreszenz im UV-Licht, eluiert man ein drittes Mal mit 2 ml Chloroform-Methanol. Zur Extraktion der Porphyrinmethylester werden der organischen Phase 10 ml 1proz. (w/v) wäbr. NaHCO₃-Lösung zugegeben. Dabei gehen die Porphyrinmethylester sofort bei geringem Schütteln nahezu vollständig in die Chloroformphase, die auf Rotfluoreszenz kontrolliert und in ein Spitzkölbchen abgezogen wird, wobei sich die Filtration durch ein mit CHCl₃ getränktes Filter, in welches 0,1 g Na₂SO₄ vorgelegt wurde, als zweckmäßig erwies, um das Chloroform möglichst wasserfrei zu bekommen. Anschließend wird die wäbr. Phase, deren pH bei

7 liegt, mit 1 ml Chloroform ausgeschüttelt. Nach Abnahme des Chloroforms kann mit einer dritten Extraktion fluorenszenzoptisch bewiesen werden, ob die Extraktion der Methylester vollständig war. Das Filter wird mit etwa 1 ml Chloroform nachgespült. Mit diesem Veresterungs- und Extraktionsverfahren werden Porphyrinmengen bis zu 10 µg/ml Urin quantitativ erfaßt (Ausbeute > 99%). Der Extrakt wird an einem Rotationsverdampfer eingedampft. Steht dieser nicht zur Verfügung, wird der Chloroformextrakt in ein kleines Schliffgefäß (s. u. A.) filtriert und das Lösungsmittel (bei 40° im Wasserbad) mit Luft, N₂ oder CO₂ abgeblasen.

Man löst den Rückstand in einem definierten Volumen Chloroform (50–500 µl), welches, je nach der Intensität der Rotfluoreszenz, vollständig oder nur teilweise auf eine vorbehandelte DC-Karte SI bandförmig aufgetragen wird. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgt im Lösungsmittelsystem Benzol-Essigsäureäthylester-Methanol (85:13,5:1,5, v/v) (3) ein- bis zweimal im Vergleich zu Bezugssubstanzen (2) (Abb. 3). Nach Markierung der rotfluoreszierenden Banden im UV-355 nm überführt man die zugehörigen Kieselgelzonen in ein sehr kleines Faltenfilter und eluiert die Porphyrinmethylester mit warmem Chloroform (40°), das anschließend verdampft oder abgeblasen wird. Die Substanzen werden nun in der 0,05proz. Kupfer(II)-acetat-Gebrauchslösung (1) wieder gelöst und spektrophotometrisch gemessen. Die Porphyrinausscheidung wird nach der Formel

$$\mu\text{g Kopro(Uro)porphyrin/24 Std.} = \frac{E \cdot \text{Mol.-Gew.} \cdot V_M \cdot V_U}{\epsilon_{mM} \cdot d \cdot 5}$$

(ϵ_{mM} (1), V_M = Meßvolumen, V_U = Urinvolumen/24 Std.) berechnet (1). Trägt man nur ein Aliquot der Porphyrinmethylester-Lösung in Chloroform auf die DC-Karte auf, so ist der daraus resultierende Faktor zusätzlich zu berücksichtigen.

Besprechung der Methodik

Dem Standardverfahren zur Bestimmung der Gesamtporphyrine wurden nur Kopro- und Uroporphyrin analytisch (Absorptionsmaxima, Extinktionskoeffizienten) zugrunde gelegt (Abb. 1 und 2), da, wie aus den bisherigen chromatographischen Untersuchungen normaler und porphyrischer Urine hervorging (1, 2), Protoporphyrin im Urin nicht vorkommt. Diese Frage wird jedoch noch einmal gesondert bearbeitet, da sich auch in der neueren Literatur Angaben über Protoporphyrin im Urin nicht nur beim Vorliegen einer hepatischen Porphyrie, sondern auch als physiologische Urinkomponente finden. Wahrscheinlich beruhen diese Ergebnisse auf Methoden, die zur Differenzierung von Kopro- und Protoporphyrin nicht hinreichend spezifisch sind.

Die obere Grenze des Standardverfahrens ist in erster Linie durch die Adsorptionskapazität der verwendeten Talkmenge bedingt. Mit 0,2 g Talk wird die Bestimmung bei 1 µg Porphyrine/ml Urin limitiert. Bei 2 mg Porphyrinen/ml Urin werden unter diesen Bedingungen 40% der Porphyrine nicht mehr adsorbiert. Mit einem Gehalt ab 0,6 µg Gesamtporphyrine/ml Urin fluoresziert das Adsorbens unter dem UV-Licht (Hochdruckbrenner, s. bei A.) leuchtend rot. In solchen Fällen empfiehlt sich neben einer Fluoreszenzkontrolle des Leerwertfilters die weitere Aufarbeitung und Analyse nach Methode B. Bei Extinktionen über 0,4 im Standardverfahren kann der Rest der zur spektrophotometrischen Analyse filtrierten Lösung dazu verwendet werden, Aufschluß über die qualitative Zusammensetzung

zung der Urinporphyrine zu erhalten, indem man das Lösungsmittelgemisch verdampft, den Rückstand in 20 bis 50 μ l Chloroform wieder aufnimmt und auf eine DC-Karte aufträgt, die wie in Methode B beschrieben chromatographisch entwickelt und unter dem 355 nm-UV-Licht beurteilt wird.

Die Verwendung eines mittleren millimolaren Extinktionskoeffizienten von Kopro- und Uroporphyrinmethylester-Cu-Chelaten zur Bestimmung der Gesamtporphyrine nach Methode A schließt einen Meßfehler von 10% ein, bezogen auf die molare Absorption der Substanzen an ihrem Soret-Maximum (1). Obwohl dieses Verfahren deshalb in erster Linie als ein Suchtest ausgearbeitet wurde, korrelieren in einer vorläufigen Studie die hiermit erhaltenen Normalwerte mit bekannten Daten. Von 20 Analysen lagen 17 eindeutig im Normalbereich: $\bar{x} \pm 2s = 81 \pm 48$ (μ g/Tag), Bereich 53–137 μ g/Tag; ein etwas höherer, aber nicht näher geklärter Porphyringehalt fand sich in den übrigen drei Proben (194, 251 und 308 μ g/Tag). Eine abschließende Beurteilung der Normalwerte erfolgt nach der Untersuchung eines größeren Kollektivs mit den Methoden A und B sowie durch direkte fluorometrische Analysen der Porphyrinchromatogramme.

Die Lage der Analysenergebnisse aus porphyrischen Urinen (Porphyria cutanea tarda) im Suchtest (A) nahe der Eichgeraden des spektrophotometrisch gemessenen Uroporphyrinmethylester-Cu-Chelates (Abb. 2) stimmt mit den dünnstschichtchromatographischen Untersuchungen dieser Urine überein, bei denen regelmäßig neben dem Hervortreten der Porphyrine mit 5, 6 und vor allem 7 Carboxylgruppen eine überwiegende Zunahme des Uroporphyrins (Abb. 3) und eine Umkehr des Verhältnisses von Kopro- zu Uroporphyrin gegenüber dem Normalurin gefunden wurden.

Kritische Seiten des Standardverfahrens

1. Filter und Talksicht müssen nach der Adsorption vollständig getrocknet werden, um eine quantitative Veresterung unter den

angegebenen Bedingungen zu garantieren, die die Voraussetzung für die Bildung der Porphyrin-Chelate ist (Abb. 1c).

2. Nach der Zugabe von Na_2CO_3 muß das pH mit Indikatorpapier kontrolliert werden. Cu(II)-acetat löst sich in Wasser schwerer als in Methanol und fällt in reinem Methanol unter pH 6 aus. Diese Versuche wurden mit nicht nachgetrocknetem Methanol p. a. durchgeführt. Verwendet man Methanol auch als einziges Lösungsmittel für die Methylester der Urinporphyrine im gesamten Analysengang, fällt das Kupferacetat schon bei pH 6 aus. Schwefelsäure dehydratisiert in einem organischen Lösungsmittel das $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu} \cdot \text{H}_2\text{O}$, so daß die ursprünglich blaue Lösung heller wird und das Kupfersalz bei größeren H^+ -Ionen-Konzentrationen partiell entfärbt ausfällt. Wahrscheinlich bewirken schon geringe Säurekonzentrationen eine so starke Protonierung des Stickstoffs im Tetrapyrrolsystem, daß für das Kupfer keine Bindungsmöglichkeiten mehr vorhanden sind. Da eine geringe Farbabschwächung der Kupferacetatlösung auch bei dem Standardverfahren eintritt und demzufolge bei der spektrophotometrischen Messung gegen die reine Lösung zu hohe Extinktionen registriert werden (Abb. 1b), wird zur Nullpunkt-Eichung ein Leerwert herangezogen, der aus dem Filtrat nach der Adsorption der Porphyrine an Talk mit den gleichen Arbeitsgängen hergestellt wird.

Die Methode B ist absolut spezifisch durch

1. dünnstschichtchromatographische Auftrennung der Porphyrinmethylester, die im Chromatogramm mit langwelligen UV-Strahlen zur Rotfluoreszenz angeregt und damit nachgewiesen werden;

2. charakteristische Absorptionsbanden des individuellen isolierten Porphyrins in organischen Lösungsmitteln (2, 4) und

3. Bildung der Cu-Chelatkomplexe, die definierte spektrophotometrische Eigenschaften aufweisen (1).

Diese Kriterien sind zur Identifizierung der individuellen Porphyrine geeignet. Neben der Spezifität für die einzelnen Porphyrine besteht der Vorteil der Methode B in der Einfachheit, Schnelligkeit und quantitativen Reproduzierbarkeit.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg.

Herrn cand. med. BERTHOLD ULSHÖFER danken wir für die UV-Fotographie des Chromatogramms.

Literatur

1. Doss, M., diese Z. 6, 498 (1968). — 2. Doss, M., J. Chromatog. 30, 265 (1967). — 3. Doss, M., diese Z. 7, 133 (1969). — 4. FALK, J. E., Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam-London-New York (1964).

Dr. Manfred Doss
355 Marburg/Lahn
Pilgrimstein 2